

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year)
26 April 2001 (26.04.01)

International application No.
PCT/JP99/03920

Applicant's or agent's file reference
AR017PCT

International filing date (day/month/year)
22 July 1999 (22.07.99)

Priority date (day/month/year)

Applicant

TANAKA, Hiroshi et al

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
27 December 2000 (27.12.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was

☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Henrik Nyberg

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 2 月 1 日 (01.02.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/06844 A1

- (51) 国際特許分類: A01H 1/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP99/03920
- (22) 国際出願日: 1999 年 7 月 22 日 (22.07.1999)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 農林水産省農業生物資源研究所所長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL RESOURCES, MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 田中 宥司 (TANAKA, Hiroshi) [JP/JP]. 菅野 暁明 (KAYANO, Toshiaki) [JP/JP]. 宇垣 正志 (UGAKI, Masashi) [JP/JP].
- 塩原文 緒 (SHIOBARA, Fumio) [JP/JP]. 渋谷 直人 (SHIBUYA, Naoto) [JP/JP]. 小野寺 治子 (ONODERA, Haruko) [JP/JP]. 小野 和子 (ONO, Kazuko) [JP/JP]. 田切 明美 (TAGIRI, Akemi) [JP/JP]. 西澤 八重子 (NISHIZAWA, Yaeiko) [JP/JP]; 〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2 農林水産省農業生物資源研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 弁理士 山本秀策 (YAMAMOTO, Shusaku); 〒540-6015 大阪府大阪市中央区城見一丁目 2 番 27 号 クリスタルタワー 15 階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, KR, US.
- (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD FOR SUPERRAPID TRANSFORMATION OF MONOCOTYLEDON

(54) 発明の名称: 単子葉植物の超迅速形質転換法

(57) Abstract: A method for the agrobacterium transformation of a monocotyledon which involves the step of infecting an intact seed with an agrobacterium containing a desired recombinant gene.

(57) 要約:

単子葉植物のアグロバクテリウム形質転換法であって、所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで、無傷の種子を感染する工程を含む方法が提供される。

WO 01/06844 A1



アグロバクテリウム形質転換法と呼ぶことがある)が挙げられる。アグロバクテリウムは、植物病原細菌の一種である。アグロバクテリウムは、植物に感染すると、自らが有するプラスミド(例えば、TiプラスミドまたはRiプラスミド)上に存在するT-DNA領域を、植物に組込む性質を有する。アグロバクテリウム形質転換法では、植物に遺伝子を導入するための手段として、このT-DNA領域の植物への組込みを利用する。簡潔には、植物は、所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで感染される。感染後、所望の組換え遺伝子は、アグロバクテリウムから植物細胞内に移入され、そして植物ゲノムに組込まれる。

アグロバクテリウム形質転換法は、双子葉植物については、十分に確立されており、現在までに、所望の組換え遺伝子を発現する安定な形質転換植物が数多く作出されている。

対照的に、アグロバクテリウム形質転換法を単子葉植物に適用することは、従来、一般に困難であるとされてきた。例えば、Portrykusら(BIO/TECHNOLOGY, 5:35-542, 1990)は、アグロバクテリウムは、単子葉植物に感染しないと報告している。しかし、他方で、アグロバクテリウムを使用して単子葉植物を形質転換する試みは数多く行われ、その結果、アグロバクテリウム形質転換法を単子葉植物に適用できる可能性が見出されてきた。

例えば、Raineriらは、イネの胚盤部分を取り出し、傷をつけて、脱分化を誘導する培地に置床し、数日後に、その胚盤部分をアグロバクテリウムで感染した。その結果、正常な再分化個体を得るまでには至らなかったものの、外来遺伝子が導入されたカルスを誘導することに成功した(Raineri, D.M.ら、Bio/Technology, 8:33-38, 1990を参照)。

国際公開W094/00977号パンフレットは、イネおよびトウモロコシについての、アグロバクテリウム形質転換法を開示する。この方法では、アグロバクテリウム

明 細 書

単子葉植物の超迅速形質転換法

5 技術分野

本発明は、単子葉植物のアグロバクテリウム媒介性の形質転換方法に関する。

背景技術

10 植物を改良するための手段の1つとして「形質転換法」が挙げられ、形質を改変するための所望の組換え遺伝子が植物に導入される。効率の良い、迅速な形質転換法は、有用な植物、特に、主食として重要な食糧である穀物を、分子育種するにおいて極めて重要である。

15 穀物の多く（例えば、イネ、コムギ、オオムギ、およびトウモロコシ）は、単子葉植物に分類される。単子葉植物を形質転換するために、これまでに種々の形質転換法が開発されている。形質転換法は、直接的な形質転換法と間接的な形質転換法とに大きく分けられる。

20 直接的な形質転換法としては、例えば、エレクトロポレーション法（Shimamoto K. ら、Nature、338:274-276、1989；およびRhodes C. A. ら、Science、240:204-207、1989を参照）、パーティクルガン法（Christou P. ら、Bio/Technology 9: 957-962、1991を参照）ならびにポリエチレングリコール（PEG）法（Datta, S. K. ら、Bio/Technology、8:736-740、1990を参照）が挙げられる。エレクトロポレーション法およびパーティクルガン法は、遺伝子を比較的効率良く導入し得る方法として、単子葉植物を形質転換するために一般に使用されてきた。

間接的な形質転換法としては、アグロバクテリウム媒介性の形質転換法（以下、

で形質転換するための植物試料として、脱分化過程にあるかまたは脱分化した培養組織（例えば、カルス）を使用することを必要とする。このため、アグロバクテリウムでの感染の前に、形質転換しようとする植物試料（例えば、葉切片）から脱分化された培養組織を作製するために、通常、3～4週間の脱分化誘導期間を必要とする。

国際公開W095/06722号パンフレットは、イネおよびトウモロコシの未熟胚をアグロバクテリウムで感染する方法を開示する。しかし、未熟胚を取り出すための作業は多大な労力を要する。

従って、より迅速で、効率の良い、単子葉植物のアグロバクテリウム形質転換法が利用できれば、イネなどの穀物を含む、有用な単子葉植物の分子育種に大いに貢献できる。

発明の開示

本発明は、上記課題の解決を意図するものである。本発明の目的は、単子葉植物のアグロバクテリウム形質転換法における改良を提供することにある。本発明の方法によれば、従来のアグロバクテリウム形質転換法よりも効率良く、はるかに迅速に、形質転換植物を作出することが可能である。

本発明は、単子葉植物の形質転換方法に関し、所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで、無傷の種子を感染する工程を包含する。本発明の方法において、種子は、無傷の状態で感染され、形質転換しようとする植物試料を脱分化するなどの処理は必要とされない。

アグロバクテリウムでの感染に供される種子は、播種後4～5日目の種子であり得る。また、感染の時点で、種子は、発芽した状態であり得る。

形質転換される単子葉植物は、好ましくはイネ科植物であり、より好ましくは

イネ (*Oryza sativa* L.) である。

図面の簡単な説明

図 1 は、アグロバクテリウムを感染する直前のイネ種子の状態を示す、生物の形態を示す写真である。

図 2 は、播種から約 50 日目の、本発明の方法により得られたイネの再分化個体を示す、生物の形態を示す写真である。

図 3 (a) は、播種後約 90 日目の従来法による形質転換体と、播種後約 50 日目の本発明の方法による形質転換体とを比較した、生物の形態を示す写真であり、

図 3 (b) は、播種後約 50 日目の従来法による形質転換体と、播種後約 50 日目の本発明の方法による形質転換体とを比較した、生物の形態を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳しく説明する。

本発明の方法が適用される「植物」は、単子葉植物である。好ましい単子葉植物としては、イネ科植物（例えば、イネおよびトウモロコシ）が挙げられる。本発明の方法が適用される最も好ましい植物は、イネであり、特に、ジャポニカイネである。また「植物」は、特に他で示さない限り、植物体、および植物体から得られる種子を意味する。

(植物発現用ベクターの作製)

単子葉植物に所望の組換え遺伝子を導入するために、所望の組換え遺伝子を含む適切な植物発現用ベクターが構築される。このような植物発現用ベクターは、当業者に周知の遺伝子組換え技術を用いて作製され得る。アグロバクテリウム形質転換法において使用するための植物発現用ベクターの構築には、例えば、pBI

実施例 2 : 従来の方法によるイネ植物の形質転換

実施例 1 に記載の方法との比較のために、日本晴を形質転換の材料として使用して、従来の方法によるイネ植物の形質転換を、以下のように行った。

2.1 カルス誘導

5 日本晴の種子を、籾殻の除去後、滅菌し、そしてカルス誘導培地 (2mg/l の 2, 4-D を含む N6D 培地) に播種し、これを明所下、30℃ で保温した。カルス誘導開始から約 4 週間後、胚盤由来の増殖したカルスを、形質転換に使用した。

2.2 形質転換

1 実施例 1 に記載されるように植物発現用ベクター pIG121Hm で形質転換したアグロバクテリウム EHA101 で、得られたカルスを感染し、2N6-AS 培地上で、暗黒下で 3 日間、28℃ で保温して共存培養した。

2.3 除菌および選抜

500mg/l カルベニシリンを含有する N6D 培地を用いて、カルスから、アグロバクテリウムを洗い流した。次いで、形質転換されたカルスの選抜を、以下の条件で行った。

第 1 回目の選抜 : カルベニシリン (500mg/l) およびハイグロマイシン (50mg/l) を補充した 2 mg/l の 2, 4-D を含む N6D 培地上にカルスを置き、2 週間、27℃ ~ 32℃ で保温した。

20 第 2 回目の選抜 : カルベニシリン (500mg/l) およびハイグロマイシン (50mg/l) を補充した 2 ~ 4 mg/l の 2, 4-D を含む N6D 培地上にカルスを置き、さらに 2 週間、27℃ ~ 32℃ で保温した。

2.4 再分化、発根および鉢上げ

選抜された形質転換種子を、実施例 1 と同様の条件で再分化させ、鉢上げまでを行った。

2.5 結果

従来の方法による形質転換の例と、本発明の方法による形質転換の例との比較を図3に示す。播種後、形質転換体の鉢上げまでに必要な日数は、従来法においては約90日であったのに対して、本発明の方法においては約50日であった（図3（a））。播種後約50日目の時点で比較すると、本発明の方法における形質転換体は鉢上げ可能な状態であったのに対し、従来法における形質転換体は、未だ再分化の過程にあった（図3（b））。まとめると、本発明の方法の実施により、形質転換に要する期間が、従来法の約3分の2以下に短縮された。

産業上の利用可能性

本発明によれば、改良された、アグロバクテリウム媒介性の単子葉植物の形質転換方法が提供される。本発明の方法においては、形質転換を意図される植物の無傷の種子が、所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで感染される。本発明の使用により、より効率良く、そしてより迅速に、形質転換植物を作出することが可能となる。

転換植物を作出することが可能である。

(実施例)

以下に実施例を挙げて、本発明を具体的に説明する。この実施例は、本発明を限定するものではない。実施例で使用した、材料、試薬などは、他に特定の無い限り、商業的な供給源から入手可能である。

実施例 1 : 本発明の方法によるイネ植物の形質転換

イネの代表的品種である日本晴の種子を、籾殻の除去後、無傷の状態で、2.5%次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) 溶液中で殺菌した。水での十分な洗浄の後、イネを以下の無菌操作に供した。

1.1 前培養

種子を、2,4-Dを含むN6D培地 (30g/lスクロース、0.3g/lカザミノ酸、2.8g/lプロリン、2mg/l 2,4-D、4g/lゲルライト、pH5.8) に播種し、5日間、27℃~32℃で保温した。この間に種子は発芽した (図1)。

1.2 植物発現用ベクター

アグロバクテリウムを形質転換するための植物発現用ベクターとして、ヒマのカタラーゼ遺伝子の第1イントロンを含むGUS遺伝子と、ハイグロマイシン抵抗性遺伝子とが連結されたプラスミドである、pIG121Hmを用いた (中村ら、植物バイオテクノロジーII、現代化学増刊、pp.123-132 (1991))。pIG121Hmで、アグロバクテリウムEHA101を形質転換した (Hoodら、J. Bacteriol., 168:1291-1301 (1986))。EHA101は、ヘルパープラスミドのvir領域が強病原性アグロバクテリウムA281由来の菌である。

1.3 アグロバクテリウム感染

形質転換されたアグロバクテリウムの懸濁液に、前培養した上記種子を浸漬した後、2N6-AS培地 (30g/lスクロース、10g/lグルコース、0.3g/lカザミノ酸、2m

g/l 2, 4-D、10mg/l アセトシリゴン、4g/lゲルライト、pH5. 2) に移植した。

暗黒下で3日間、28℃で保温して共存培養した。

1. 4 除菌および選抜

共存培養の完了後、500mg/lカルベニシリンを含有するN6D培地を用いて、種子
5 から、アグロバクテリウムを洗い流した。次いで、形質転換された種子の選抜を、
以下の条件で行った。

第1回目の選抜：カルベニシリン（500mg/l）およびハイグロマイシン（25mg/
1) を補充した、2 mg/lの2, 4-Dを含むN6D培地上に、種子を置き、7日間、27℃
～32℃で保温した。

10 第2回目の選抜：カルベニシリン（500mg/l）およびハイグロマイシン（25mg/
1) を補充した、2～4 mg/lの2, 4-Dを含むN6D培地上に、種子を置き、さらに7
日間、27℃～32℃で保温した。

1. 5 再分化

選抜された形質転換種子を、以下の条件で再分化させた。

15 第1回目の再分化：再分化培地（カルベニシリン（500mg/l）およびハイグロマ
イシン（25mg/l）を補充したMS培地（30g/lスクロース、30g/lソルビトール、2g
/lカサミノ酸、2mg/lカイネチン、0. 002mg/l NAA、4g/lゲルライト、pH5. 8）上
に、選抜した種子を置き、2週間、27℃～32℃で保温した。

第2回目の再分化：第1回目の再分化において使用したのと同じ再分化培地を使
20 用して、さらに2週間、27℃～32℃で保温した。

1. 6 鉢上げ

再分化した形質転換体を、発根培地（ハイグロマイシン（25mg/l）を補充した、
ホルモンを含まないMS培地）上に移して、根の発育を確認した後に、鉢上げた。
（図2）。

(例えば、ミトコンドリア、葉緑体など)に含まれるゲノムを含んでいう。

形質転換が意図される植物の種子は、糊殻を除去した後、無傷の状態で前培養される。種子に関して「無傷」とは、種子が、胚珠を除去すること、および胚盤を傷つけることなどの人為的な操作を受けていない状態であることをいう。

5 前培養において、種子は、適切な濃度のオーキシシン（例えば、2, 4-D）を含む培地（例えば、N6D培地）に播種されて、代表的には4日～5日間、好ましくは5日間、保温され得る。前培養は、種子の組織が脱分化過程に入る前に完了される。このときの温度は、代表的には25～35℃、好ましくは27～32℃である。前培養の完了後、種子は殺菌され、次いで水で十分に洗浄される。次いで、種子は、
10 無菌操作下で、形質転換されたアグロバクテリウムで感染され得る。

アグロバクテリウムでの感染（共存培養）の間、種子は、暗黒下で、代表的には2日間～5日間、好ましくは3日間、保温される。このときの温度は、代表的には26～28℃、好ましくは28℃である。次いで、種子は、培地中のアグロバクテリウムを除菌するために、適切な除菌剤（例えば、カルベニシリン）による処理
15 に供される。形質転換された種子が、選抜マーカー（例えば、ハイグロマイシン耐性などの薬剤耐性）を基準として選抜される。

適切な除菌条件および選抜条件下での培養後、選抜された形質転換種子は、適切な植物調節物質を含む再分化培地（例えば、MS培地）に移され、適切な期間、保温され得る。植物体を再生するためには、再分化した形質転換体は、発根培地
20 （例えば、植物調節物質を含まないMS培地）に移される。根の発育が確認された後、形質転換体は、鉢上げされ得る。

植物に導入された所望の組換え遺伝子は、植物において意図される目的（例えば、目的とされる新たな形質の発現、またはある内因性の遺伝子の発現の制御）のために作用し得る。

所望の組換え遺伝子が植物に導入されたか否かは、当業者に周知の手法を用いて、確認され得る。この確認は、例えば、ノーザンブロット解析を用いて行い得る。具体的には、再生した植物の葉から全RNAを抽出し、変性アガロースでの電気泳動の後、適切なメンブランにブロットする。このブロットに、導入遺伝子の一部分と相補的な標識したRNAプローブをハイブリダイズさせることにより、目的の遺伝子のmRNAを検出し得る。あるいは、所望の組換え遺伝子の導入によって、植物における内因性遺伝子の発現制御が所望される場合、標的となる内因性遺伝子の発現を、例えば、上記のノーザンブロット解析を用いて、試験し得る。標的となる内因性遺伝子の発現が、非形質転換のコントロール植物におけるその発現に比べて有意に抑制されている場合、所望の組換え遺伝子は植物に導入され、そして発現の制御に作用したことが確認される。

従来の方法は、アグロバクテリウムでの感染の前に、通常、3～4週間の脱分化誘導期間を必要とする。対照的に、本発明の方法は、脱分化を誘導する工程を必要としないので、形質転換単子葉植物を作出するために必要な日数を短縮することが可能である。さらに、本発明の方法によれば、従来法における選抜に要する期間を短縮することも可能となり、培養変異の影響を低減することが可能となる。

本発明の方法の好ましい1つの実施態様において、形質転換単子葉植物を作出するために必要とされる日数は約50日であり、従来のアグロバクテリウム形質転換方法（例えば、下記実施例2を参照）において必要とされる日数（約90日）の約3分の2以下である。また、本発明の方法によれば、日本晴の種子の場合で、10～15%の形質転換効率が得られる。どんとこい、キタアケなどの他のイネ品種でも同程度に高い形質転換効率が達成可能である。従って、本発明の方法を使用することによって、従来の形質転換法よりも効率良く、および迅速に、形質

系のベクターが好適に用いられるが、これらに限定されない。

「所望の組換え遺伝子」は、植物に導入されることが所望される任意のポリヌクレオチドをいう。本発明における所望の組換え遺伝子は、天然から単離されたものに限定されず、合成ポリヌクレオチドも含み得る。合成ポリヌクレオチドは、例えば、配列が公知の遺伝子を、当業者に周知の手法によって合成または改変することにより入手し得る。本発明における所望の組換え遺伝子としては、例えば、形質転換される植物において発現が所望される、その植物に対して内因性または外因性である任意のポリヌクレオチド、および植物においてある内因性遺伝子の発現制御が所望される場合の、その標的となる遺伝子のアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

植物において発現が意図される場合、所望の組換え遺伝子は、自己のプロモーター（すなわち、天然において該遺伝子が作動可能に連結しているプロモーター）を作動可能な様式で含むか、または自己のプロモーターを含まない場合もしくは自己のプロモーター以外のプロモーターをさらに含むことが所望される場合、任意の適切なプロモーターと作動可能に連結される。使用され得るプロモーターとしては、構成的プロモーター、および植物体の一部において選択的に発現するプロモーター、ならびに誘導性のプロモーターが挙げられる。

植物発現用ベクターにおいて、さらに種々の調節エレメントが宿主植物の細胞中で作動し得る状態で連結され得る。調節エレメントは、好適には、選抜マーカー遺伝子、植物プロモーター、ターミネーター、およびエンハンサーを含み得る。使用される植物発現用ベクターのタイプおよび調節エレメントの種類が、形質転換の目的に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

「選抜マーカー遺伝子」は、形質転換植物の選抜を容易にするために使用され得る。ハイグロマイシン耐性を付与するためのハイグロマイシンフォスフトラ

ンスフェラーゼ (HPT) 遺伝子、およびカナマイシン耐性を付与するためのネオマイシンフォスフトランスフェラーゼII (NPTII) 遺伝子のような薬剤耐性遺伝子が好適に用いられ得るが、これらに限定されない。

「植物プロモーター」は、選抜マーカー遺伝子に作動可能に連結される、植物で発現するプロモーターを意味する。このようなプロモーターの例としては、カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) の35Sプロモーター、およびノパリン合成酵素のプロモーターが挙げられるが、これらに限定されない。

「ターミネーター」は、遺伝子のタンパク質をコードする領域の下流に位置し、DNAがmRNAに転写される際の転写の終結、およびポリ A配列の付加に関与する配列である。ターミネーターの例としては、CaMV35Sターミネーター、およびノパリン合成酵素遺伝子のターミネーター (Tnos) が挙げられるが、これらに限定されない。

「エンハンサー」は、目的遺伝子の発現効率を高めるために用いられ得る。エンハンサーとしては、CaMV35Sプロモーター内の上流側の配列を含むエンハンサー領域が好適である。エンハンサーは、1つの植物発現用ベクターあたり複数個用いられ得る。

(植物の形質転換)

単子葉植物の形質転換に用いられるアグロバクテリウムは、任意のアグロバクテリウム属細菌であり得、好ましくは *Agrobacterium tumefaciens* である。アグロバクテリウムは、所望の組換え遺伝子を含む植物発現用ベクターで (例えば、エレクトロポレーションによって) 形質転換される。形質転換されたアグロバクテリウムで種子を感染することにより、所望の組換え遺伝子を植物に導入し得る。導入された組換え遺伝子は、植物中のゲノムに組み込まれて存在する。なお、植物中のゲノムとは、核染色体のみならず、植物細胞中の各種オルガネラ

請求の範囲

1. 単子葉植物の形質転換方法であって、所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで、無傷の種子を感染する工程を包含する、方法。

5.

2. 前記種子が、播種後4～5日目の種子である、請求項1に記載の方法。

3. 前記種子が、発芽種子である、請求項2に記載の方法。

10

4. 前記単子葉植物が、イネ科植物である、請求項3に記載の方法。

5. 前記イネ科植物が、イネである、請求項4に記載の方法。

図 1



1

7-10

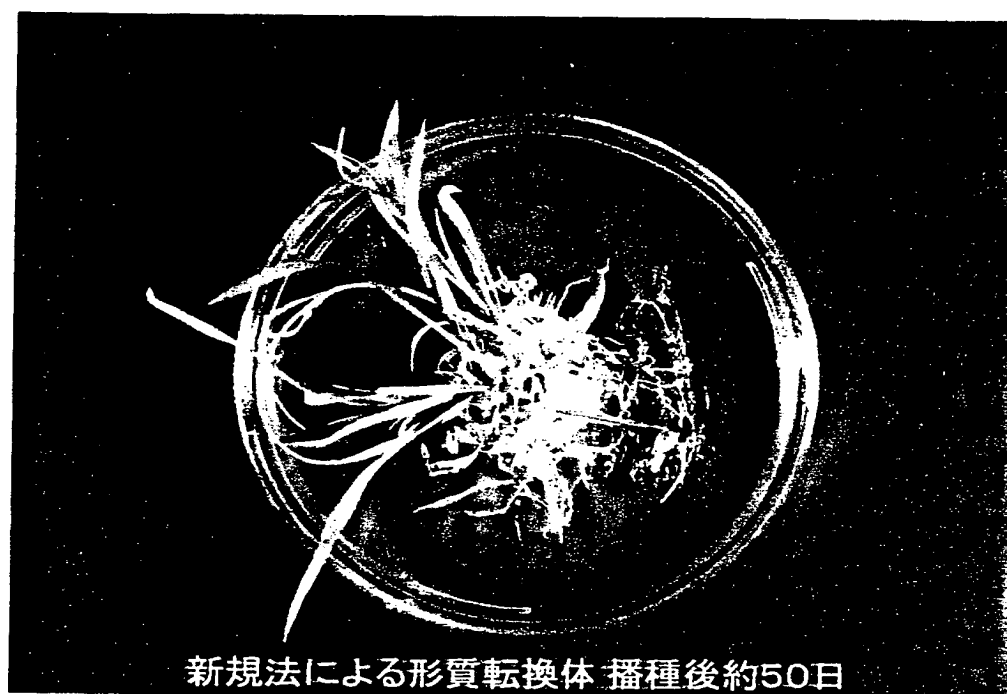
 $\frac{1}{2} \cdot \frac{1}{2}$

•

8

•

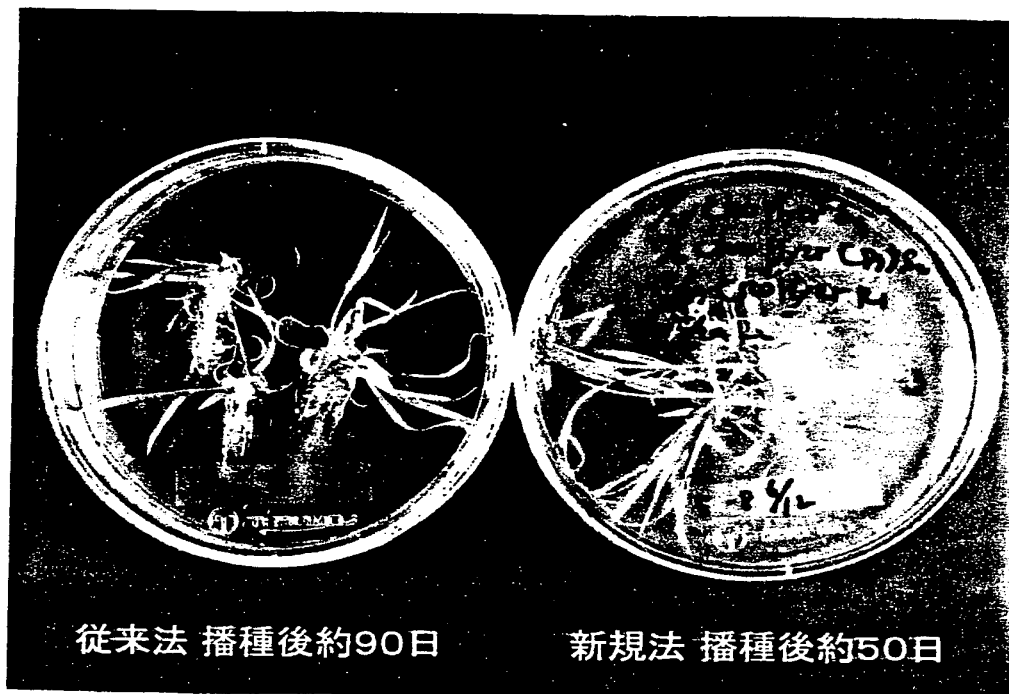
図 2



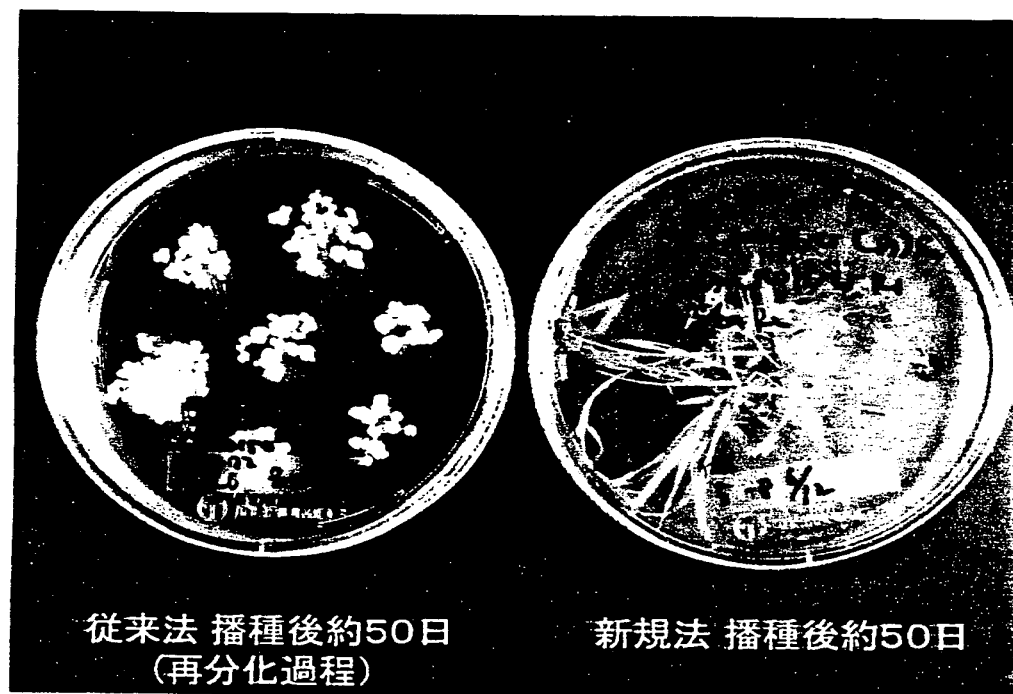
344

345

(a)



(b)



2

3

4

5

6

7

8

9

10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03920

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ A01H1/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ A01H1/00Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1940-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-1999
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-1999 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-1999Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS (DIALOG), [Agrobacterium?*monocot?*seed?]
WPI/L (QIESTEL), [Agrobacterium?*monocot?]

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. Plant Biochem. Biotech., Vol. 4(2), 55-59 (1995),	1
Y	Full text	2-5
Y	Indian J. Exp. Biol., Vol. 35(5), 416-426 (1997), Page 420, right column, lines 7 to 27	1-5
A	Plant Mol. Biol., Vol. 29(1), 125-133 (1995), Full text	1-5
A	J. Plant Biol., Vol. 38(4), 365-371 (1995), Full text	1-5

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

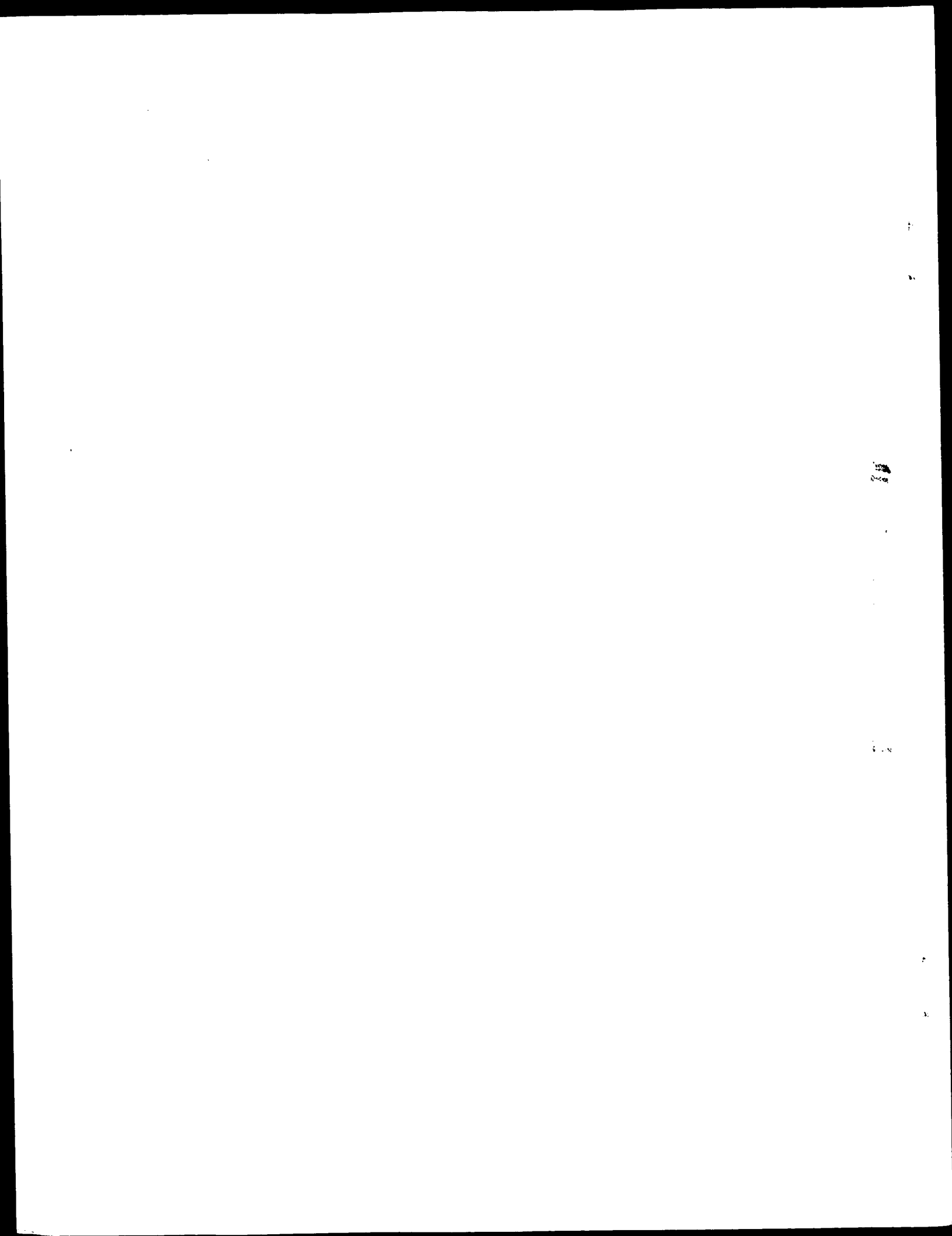
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
28 October, 1999 (28. 10. 99)Date of mailing of the international search report
9 November, 1999 (09. 11. 99)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/03920

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ A01H1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl.⁸ A01H1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), [Agrobacterium?*monocot?*seed?]
WPI/L (QIESTEL), [Agrobacterium?*monocot?]

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	J. Plant Biochem. Biotech., Vol. 4(2), 55-59(1995), 全文	1 2-5
Y	Indian J. Exp. Biol., Vol. 35(5), 416-426(1997), 第420頁右欄 第7-27行	1-5
A	Plant Mol. Biol., vol. 29(1), 125-133(1995), 全文	1-5
A	J. Plant Biol., Vol. 38(4), 365-371(1995), 全文	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 10. 99

国際調査報告の発送日

09.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

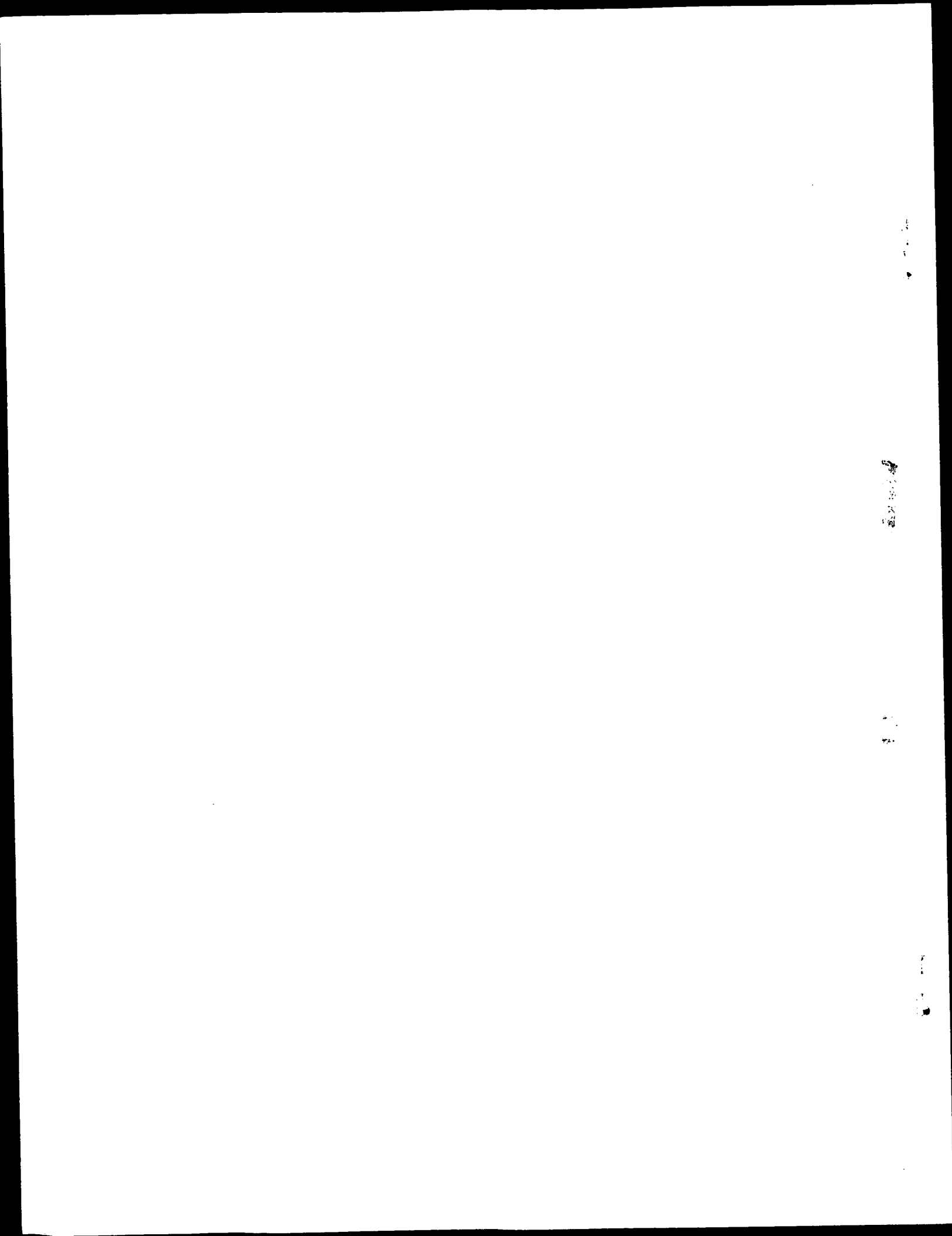
秋月 美紀子

印

2B

9516

電話番号 03-3581-1101 内線 3237



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference AR017PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/03920	International filing date (day/month/year) 22 July 1999 (22.07.99)	Priority date (day/month/year)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A01H 1/00		
Applicant JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF AGROBIOLOGICAL RESOURCES MINISTRY OF AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 3 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

 These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:
 - I ☒ Basis of the report
 - II ☐ Priority
 - III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
 - IV ☐ Lack of unity of invention
 - V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
 - VI ☐ Certain documents cited
 - VII ☐ Certain defects in the international application
 - VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 27 December 2000 (27.12.00)	Date of completion of this report 16 May 2001 (16.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

21

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03920

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

1990

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/03920

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-5	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-5

The inventions set forth in Claims 1-5 appear to involve an inventive step with respect to the documents cited in the international search report. None of the documents cited in the international search report describes or suggests infecting an intact seed with an Agrobacterium containing a desired recombinant gene.

173
174
175

176
177
178

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔PCT36条及びPCT規則70〕

REC'D 01 JUN 2001

WIPO

PCT

出願人又は代理人 の書類記号 AR017PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 99/03920	国際出願日 (日.月.年) 22.07.99	優先日 (日.月.年)
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. 7 A01H 1/00		
出願人 (氏名又は名称) 農林水産省農業生物資源研究所所長が代表する日本国		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。

(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)

この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 27.12.00	国際予備審査報告を作成した日 16.05.01	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 長 井 啓 子	2 B 9 1 2 3
電話番号 03-3581-1101 内線 3236		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (1998年7月)

1000

1000

1000

1000

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT19条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1-5 有
請求の範囲 無

進歩性(IS)

請求の範囲 1-5 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(IA)

請求の範囲 1-5 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1-5について

請求の範囲1-5に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献に対して進歩性を有する。国際調査報告で引用されたいずれの文献にも、無傷の種子を所望の組換え遺伝子を含むアグロバクテリウムで感染することについて記載も示唆もされていない。

3

4

5

EP



PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
〔PCT18条、PCT規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 AR017PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/03920	国際出願日 (日.月.年) 22.07.99	優先日 (日.月.年)
出願人 (氏名又は名称) 農林水産省農業生物資源研究所所長		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

- a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。
☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。
- b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。
☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

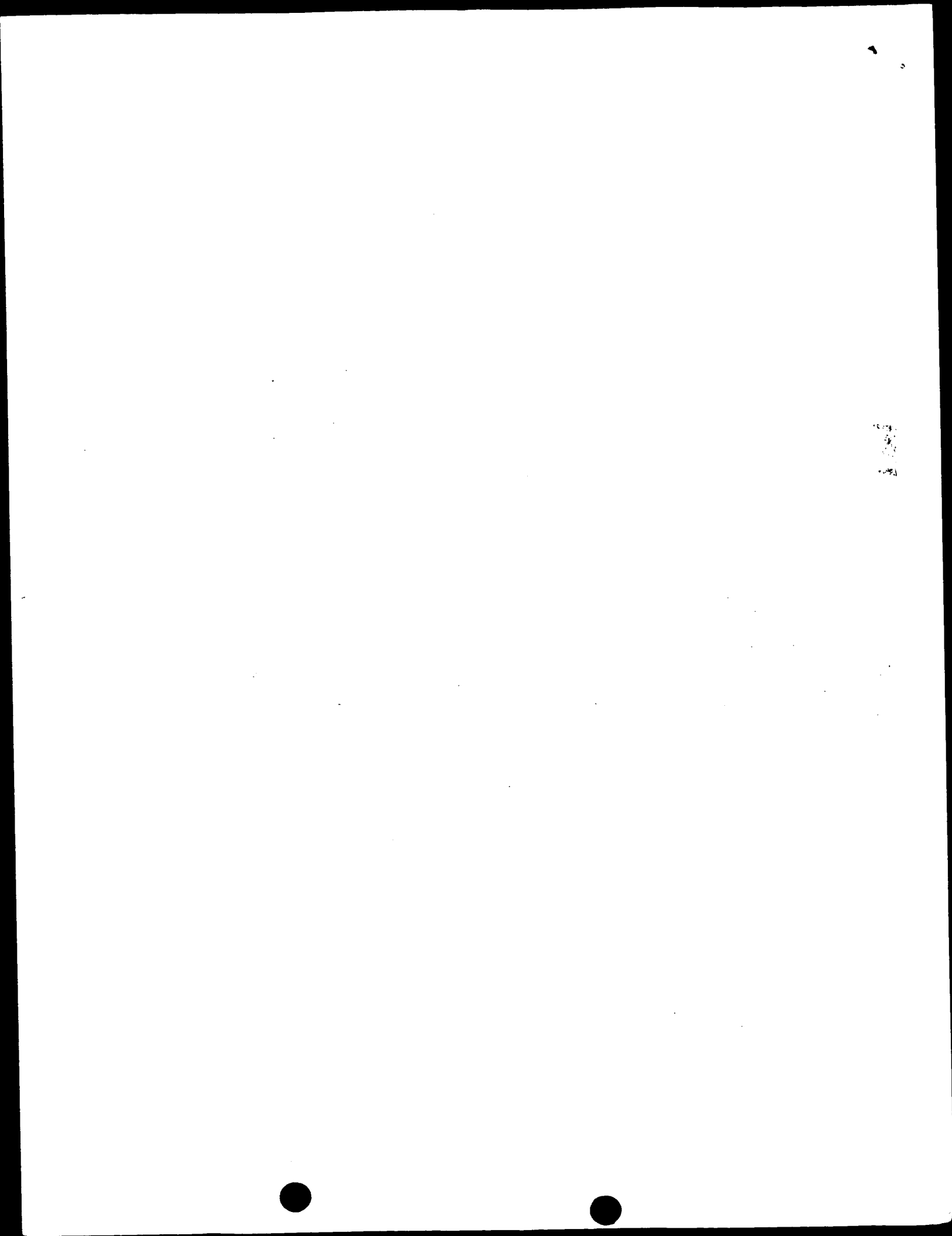
2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。
☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
 第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。 ☒ なし
☐ 出願人は図を示さなかった。
☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ A01H1/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁶ A01H1/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1940-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-1999年
日本国登録実用新案公報 1994-1999年
日本国実用新案登録公報 1996-1999年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
BIOSIS (DIALOG), [Agrobacterium?*monocot?*seed?]
WPI/L (QIESTEL), [Agrobacterium?*monocot?]

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	J. Plant Biochem. Biotech., Vol. 4(2), 55-59(1995), 全文	1 2-5
Y	Indian J. Exp. Biol., Vol. 35(5), 416-426(1997), 第420頁右欄 第7-27行	1-5
A	Plant Mol. Biol., vol. 29(1), 125-133(1995), 全文	1-5
A	J. Plant Biol., Vol. 38(4), 365-371(1995), 全文	1-5

☐ C欄の続きにも文献が列举されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 10. 99

国際調査報告の発送日

09.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

秋月 美紀子

2B

9516

電話番号 03-3581-1101 内線 3237

